

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 13 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461190

研究課題名(和文)非小細胞肺癌におけるサイトケラチン崩壊による浸潤亢進機序の解明と抗浸潤療法の開発

研究課題名(英文) Analysis of the invasive mechanism of non-small lung cancer via cytokeratin collapse and development of anti-invasion therapy

研究代表者

坂東 修二 (Bandoh, Shuji)

香川大学・医学部・講師

研究者番号：60314928

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：我々は非小細胞肺癌で外科的切除を受けた組織標本を用いてビメンチン発現と予後との関連を評価した。また、siRNAを用いたビメンチンの遺伝子発現抑制実験やマトリゲルを用いて浸潤能を高めた細胞株を用いた実験を行った。マトリゲルを用いた実験では細胞株のビメンチン発現と浸潤能は相関していた。また、切除標本を用いた実験ではビメンチンの発現と予後の悪さが関連しており、それは扁平上皮癌より腺癌で有意に関連していた。浸潤能の高い細胞株はビメンチンの発現が高く、ビメンチン遺伝子の発現を抑制した場合は浸潤能が低下した。以上よりビメンチンは非小細胞肺癌の浸潤能を変化させることでその予後に影響を与えているといえる。

研究成果の概要(英文)：We evaluated the association between vimentin expression in resected non-small cell lung cancer(NSCLC) specimens and prognosis. Short-interfering RNA interference targeting vimentin and establishment of an invasive cell line by repeated selection of invasive cells using a Matrigel membrane invasion chamber system (MICS) were performed. A MICS was used to reveal the relationship between invasiveness and vimentin. Vimentin positivity was significantly associated with a poor prognosis and was significantly lower in squamous cell carcinoma than in adenocarcinoma. In in vitro experiments, silencing of vimentin reduced invasiveness. Highly invasive cell lines showed higher expression of vimentin than did the parental cells and decreased the invasive ability was reduced by knockdown of vimentin. Vimentin expression is associated with the prognosis via alteration of the invasive ability of NSCLC cells.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：ビメンチン 肺癌 浸潤能 マトリゲル

1. 研究開始当初の背景

(1) 肺癌は先進諸国における癌死亡原因の第1位であり、その組織浸潤の程度が強いほど予後は悪化する。従って肺癌の治療においては癌細胞の浸潤能を抑制することが重要と考えられている。

(2) これまで我々は中間径フィラメントであるサイトケラチン及びビメンチンの肺癌における機能的役割を検討してきた¹⁻⁶⁾。

(3) サイトケラチンについては、発現量が低下するほど肺癌細胞は浸潤能が亢進することが証明できたが、ビメンチンが肺癌の浸潤能に対してどのような影響を与えているかは解明されていなかった。

2. 研究の目的

中間径フィラメントであるビメンチン分子が非小細胞肺癌患者の予後に与える影響と、その機序について検討し、新たな抗浸潤療法開発に資することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ビメンチンの発現と予後の相関

1995年から1999年までに香川大学医学部附属病院にて手術が施行された肺癌症例108例において得られた腫瘍組織に対してビメンチンの免疫染色を行った。

ビメンチンの発現については同一切片中の腫瘍組織において、腫瘍組織内におけるビメンチン陽性細胞の比率(陰性:0-10% 68名、陽性:50%以上 40名)と生存期間について検討した。観察期間は60ヶ月。手術に伴う合併症による死亡や他病死についてはすべて打ち切り症例とし、腫瘍死のみをイベントとした。生存率曲線の差の検定にはログランク検定を用いた。

(2) 人為的なビメンチン発現の抑制と、浸潤能の変化

ビメンチンを標的とするsiRNA (siVIM)を肺癌細胞株のA549、RERF-LC-0K、HI1017に対して導入。ウエスタンブロット法にてsiRNAを導入した群と、コントロールsiRNA (siCont)を導入した群のビメンチン発現を比較した。浸潤能の変化についてはマトリゲル浸潤アッセイ法を用いて24時間でマトリゲルを通過した細胞数をカウントし、siContの通過数に対するsiVIMの通過数の比をとり、統計解析(t検定)を行った。また、恒常的なビメンチンの発現抑制効果を見るためにshRNA (shVIM1及びshVIM2)を用いた遺伝子発現抑制実験も行った。

(3) 高浸潤株のビメンチン発現と、ビメンチン抑制による浸潤能の変化

肺癌細胞株A549において、マトリゲル浸潤アッセイ法を用い、マトリゲルを通過した細胞を培養してさらにマトリゲルを通過させるという作業を繰り返すことで高浸潤株を作成した。オリジナルのA549(A549-0)、9回マトリゲルを通過したA549(A549-9)、18回マトリゲルを通過したA549(A549-18)に対してウエスタンブロット法を行いビメンチンの発現を比較した。また、8時間でマトリゲ

ルを通過した細胞数も比較した。さらにA549-18において、siRNAを用いてビメンチンの発現を抑制し、浸潤能の変化を検討した。

4. 研究成果

(1) ビメンチンの発現と予後の相関

(図1)

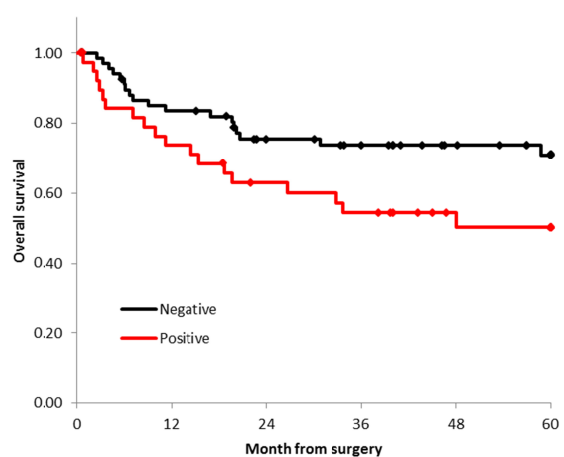
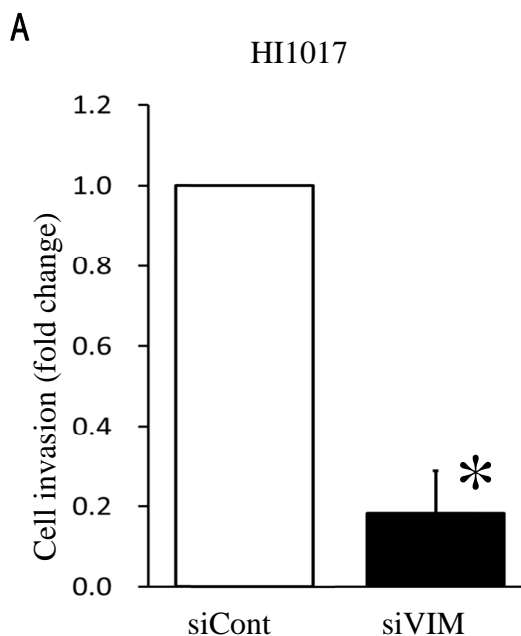


図1では手術が施行された肺癌患者108例において、その病理組織のビメンチンによる免疫染色を行い、ビメンチン陽性者(赤線)と陰性者(黒線)の生存率をカプランマイヤー曲線にて比較した結果を示している(縦軸:生存率、横軸:生存期間)。この結果ビメンチン陽性者はビメンチン陰性患者と比較して統計学的有意($p=0.038$)に予後が悪いことが判明した。

(2) 人為的なビメンチン発現の抑制と、浸潤能の変化

(図2)



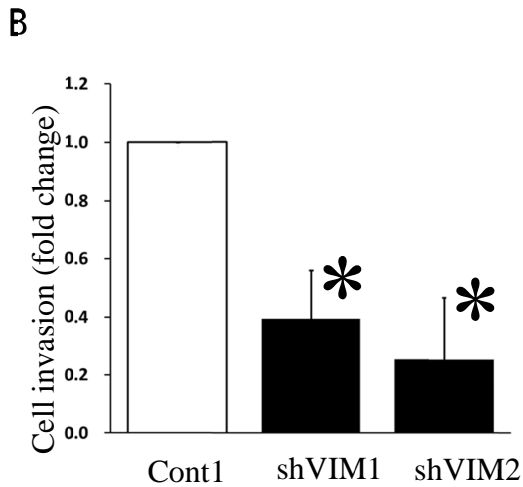


図 2A では肺癌細胞株である HI1017 細胞に対してビメンチン発現を抑制しないコントロール siRNA (siCont) を導入した場合と ビメンチン発現を抑制できるように設計された siRNA (siVIM) を導入した場合の浸潤能の差をグラフ化している (縦軸は siCont の浸潤能を 1 とした場合の浸潤能を示している)。この結果から HI1017 細胞においてはビメンチンの遺伝子発現が抑制されると浸潤能が有意に低下することが判明した。図には示していないが RERF-LC-OK 細胞でも同様の現象が確認された。

図 2B ではビメンチンの遺伝子発現を一過性では無く、恒常的に抑制するために shRNA (shVIM1 及び shVIM2) を HI1017 細胞に導入して同様の実験を行っている。この場合でも siRNA と同様にビメンチン発現を抑制された HI1017 細胞ではビメンチン発現が抑制されていない HI1017 細胞と比較して有意に浸潤能が低下することが判明した。

(3) 高浸潤株のビメンチン発現と、ビメンチン抑制による浸潤能の変化

(図 3)

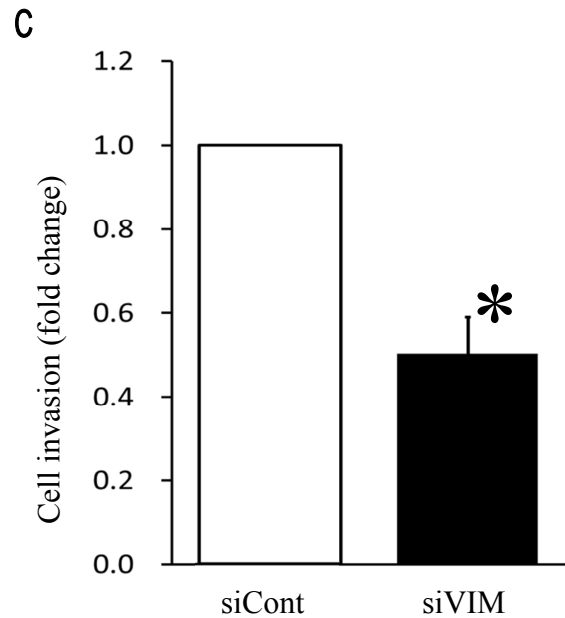
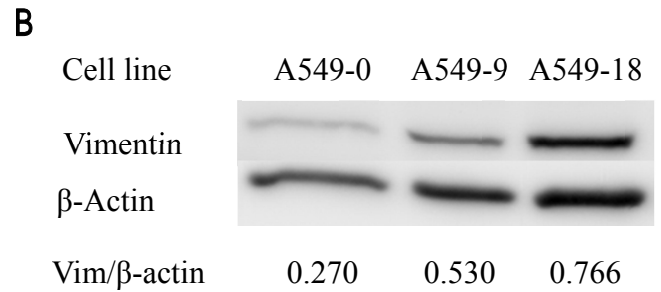
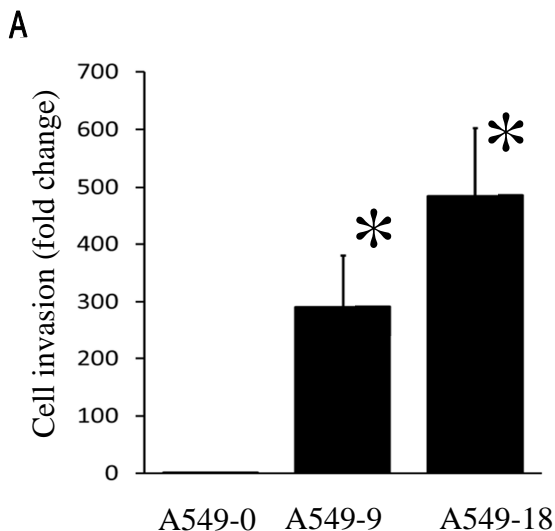


図 3A では人為的に浸潤能を亢進させた肺癌細胞株 (A549-9 及び A549-18) を用いてその浸潤能の差をマトリゲルアッセイにて観察した (縦軸は A549-0 の浸潤能を 1 とした場合の浸潤能を示す)。オリジナルの細胞株である A549-0 に対して、A549-9 及び A549-18 細胞はそれぞれ 300 倍、500 倍の浸潤能を有することが判明した。

図 3B ではこのようにして作成した高浸潤能細胞株のビメンチン発現をウエスタンブロット法にて示している。浸潤能が高い細胞ほどビメンチン発現が亢進していることが判明した。

図 3C ではビメンチン発現が亢進している A549-18 に対してビメンチン発現を抑制する siVIM を遺伝子導入した。この結果、亢進したビメンチン発現が抑制されると A549-18 細胞でも浸潤能の有意な低下が観察された。

以上より、ビメンチン発現が亢進した肺癌では浸潤能が亢進することで予後が悪化すると考えられる。ビメンチンは抗浸潤療法の新たな分子標的として有望な候補分子である。

<引用文献>

Fukunaga Y, Bandoh S, Fujita J, Yang Y, Ueda Y, Hojo S, Dohmoto K, Tojo Y, Takahara

J, Ishida T: Expression of cytokeratin 8 in lung cancer cell lines and measurement of serum cytokeratin 8 in lung cancer patients, Lung Cancer, 38: 31-38, 2002

Tojo Y, Bandoh S, Fujita J, Kubo A, Ishii T, Fukunaga Y, Ueda Y, Yang Y, Wu F, Huang CL, Yokomise H, Ishida T: Aberrant messenger RNA splicing of the cytokeratin 8 in lung cancer, Lung Cancer 42 (2): 153-161, 2003

Fujita J, Ohtsuki Y, Bandoh S, Takashima H, Ueda Y, Wu F, Tojo Y, Kubo A, Ishida T: Elevation of cytokeratin 19 fragment (CYFRA 21-1) in serum of patients with radiation pneumonitis: possible marker of epithelial cell damage, Respir Med 98 (4): 294-300, 2004

Kanaji N, Bandoh S, Fujita J, Ishii T, Ishida T, Kubo A: Compensation of type I and Type II cytokeratin pools in lung cancer, Lung Cancer 55(3): 295-302, 2007

Ishii T, Bandoh S, Fujita T, Ohtsuki Y, Tojo Y, Kanaji N, Fukunaga Y, Ueda Y, Ishida T, Kubo A: Full-length cytokeratin 8 is released and circulates in patients with non-small cell lung cancer, Tumor Biol 29(1): 57-62, 2008

Kanaji N, Bandoh S, Ishii T, Fujita J, Ishida T, Matsunaga T, Kubo A: Cytokeratins negatively regulate the invasive potential of lung cancer cell lines, Oncol Rep 26(4): 763-8, 2011

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

Tadokoro A, Kanaji N, Liu D, Yokomise H, Haba R, Ishii T, Takagi T, Watanabe N, Kita N, Kadowaki N, Bandoh S, Vimentin regulates invasiveness and is a poor prognostic marker in non-small cell lung cancer, Anticancer Research, 査読あり, 36, 2016, in press

[学会発表](計 1 件)

田所 明、金地伸拓、井上卓哉、渡邊直樹、石井知也、坂東修二: Vimentin は非小細胞肺癌の浸潤能を亢進させ予後を悪化させる、第 55 回日本呼吸器学会学術講演会、2015 年 4 月 17 日、東京国際フォーラム(東京都)

6. 研究組織

(1)研究代表者

坂東 修二 (BANDO H Shuji)

香川大学・医学部・講師

研究者番号: 60314928

(2)研究分担者

石井 知也 (ISHII Tomoya)

香川大学・医学部附属病院・助教

研究者番号: 80467836

(2)研究分担者

金地 伸拓 (KANAJI Nobuhiro)

香川大学・医学部附属病院・助教

研究者番号: 60403789

(2)研究分担者

羽場 礼次 (HABA Reiji)

香川大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号: 90304584

(2)研究分担者

藤田 次郎 (FUJITA Jiro)

琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号: 80209056